

ПРОБЛЕМИ БІОТЕХНОЛОГІЇ

УДК 576.858

О.Ю. Галкін

ОДЕРЖАННЯ ІМУНОАФІННОГО СОРБЕНТУ І РОЗРОБКА МЕТОДИКИ СПЕЦИФІЧНОГО ВИДІЛЕННЯ IgM ЛЮДИНИ

Вступ

Для виділення і очистки імуноглобулінів звертаються до широкого арсеналу методів молекулярної імунології та біохімії. При цьому всі підходи базуються на застосуванні фізико-хімічних і біологічних властивостей даної групи молекул. Найчастіше використовуються такі відмінності антитіл різних класів від інших молекул, що містяться в сироватці, як молекулярна маса, спорідненість до низки протеїнів (білки А і G), ізоелектрична точка та розчинність за різних умов [1–3]. На використанні цих відмінностей біомолекул базуються методи гель-фільтрації, афінної та іонообмінної хроматографії, діалізу, осадження солями та органічними розчинниками. Більшість підходів, які зустрічаються в літературі [1, 4, 5], передбачають поєднання кількох методів. Проте багатьом із запропонованих методик бракує чіткості протоколів експерименту, а також адекватних способів контролю чистоти імуноглобулінів. Методи виділення і очистки IgG людини, як правило, базуються на використанні афінної хроматографії на протеїнах А і G, які чітко й повно описані в науковій літературі, дають добре відтворювані результати та, на нашу думку, не потребують оптимізації. В той же час, існують різні підходи до очистки та виділення імуноглобулінів людини класів М і А: описані різними авторами схеми є багаторічними, не завжди забезпечують добре відтворювані результати, призводять до відчутних втрат імуноглобулінів, їм бракує чітких і адекватних методів контролю процесу очистки та кінцевого продукту.

Постановка задачі

Метою досліджень є одержання імуноафінного сорбенту і розробка методики специфічного виділення IgM людини та отримання препарату останнього високого ступеня чистоти.

Матеріали і методи

Одержання моноклональних антитіл. Для накопичення достатніх кількостей моноклональних антитіл (МКАТ) гібридами в кількості 10^7 – 10^8 клітин вводились в очеревинну порожнину мишам, які заздалегідь були праймовані пристаном. Антитіла з асцитичної рідини виділялись ступінчастим осадженням сульфату натрію 18 і 16 % (вага на об'єм). МКАТ розчинялись у мінімальній кількості деіонізованої води, фільтрувались через пори розміром 0,22 мкм і переводились в 0,1 М карбонатний буфер (рН 9,2) діалізом [6].

Отримання імуноафінних сорбентів. 25 мл суспензії сефарози 6В ("Sigma", США) промивалось водою на скляному фільтрі і переносилось у плоскодонну колбу на 100 мл. До сефарози додавалось 25 мл 0,5 М карбонатного буферу (рН 11) і 6,25 мл дивінілсульфону ("Sigma", США) і струшувалось на шейкері протягом 80 хв. Активованій носій фільтрувався на скляному фільтрі, промивався водою і ресуспендувався в 15 мл розчину очищених МКАТ з концентрацією 5,3 мг/мл в 0,1 М карбонатному буфері (рН 9,2). Суспензія струшувалась при кімнатній температурі протягом 12 год.

Контроль процесу синтезу імуноафінного сорбенту проводився вивченням кінетики іммобілізації МКАТ на сефарозі. Для цього протягом перших чотирьох годин через кожні 30 хв і через 6 і 12 год після початку іммобілізації з реакційної суміші відбиралось по 50 мкл надосадової рідини. Як контрольні зразки використовувались інтактні МКАТ 112C5.2, інкубовані в карбонатному буфері при кімнатній температурі. Після відбору всі проби охолоджувались й аналізувались методом твердофазного імуноферментного аналізу (ТІФА). Для цього IgM людини сорбувались на планшетах "Polysorp" ("Nunc"), вихідні антитіла і відібрані проби розводились в 100 разів і титрувались з \log_2 до 1:12800. Після інкубації і промивання вносились антивидовий кон'югат і хромоген, результати враховувались при 492 нм на спектрофотометрі Multiskan Ascent 354 (TermoLab, Фінляндія). За результатами ТІФА будувались криві залежності значень оптичної густини зразків із реакційної суміші від часу інкубації.

Після завершення синтезу для інактивації груп, які не прореагували, носій відфільтровувався, промивався водою і суспендувався в 25 мл 0,1 М карбонатного буфера із вмістом

1,5 мл етаноламіну ("Fluka", США), а потім струшувався на шейкері протягом двох годин. Далі сефароза відфільтровувалась на скляному фільтрі, промивалась водою і суспендувалась у фосфатному буфері. Приготовлений у такий спосіб імуноафінний сорбент зберігався до використання при температурі 4 °С.

Синтез передколонки. Для одержання передколонки, що дає змогу нівелювати неспецифічну взаємодію компонентів сироватки з імуноафінним сорбентом, використовувався аналогічний сефарозний носій з іммобілізованими мишачими МКАТ, які за результатами ТІФА не проявляли активності до IgM людини. Для синтезу передколонки використовувались високі концентрації моноклональних антитіл (10 мг/мл).

Імуноафінна хроматографія. Сироватка фільтрувалась через пори 0,8/0,22 мкм і додавалось до неї 0,1 % азиду натрію. На першому етапі 100 мл підготовленої сироватки пропускатись через передколонку об'ємом 10 мл з швидкістю 2 мл/хв. Елюат збирався і на другому етапі використовувався для виділення IgM людини. Дана сироватка з швидкістю 1 мл/хв пропускатись через імуноафінну колонку об'ємом 10 мл з іммобілізованими анти-IgM МКАТ. Колонка ретельно відмивалась 0,02 М фосфатним буфером з 0,15 М NaCl (рН становив 7,2–7,4) з швидкістю 2 мл/хв. Елюція IgM проводилась з тією ж швидкістю слабким 1,75 М $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ і реєструвався вихід імуноглобуліну при 280 нм. Пік IgM збирався, а колонка відмивалась фосфатним буфером упродовж 20 хв з швидкістю 2 мл/хв.

Гель-фільтрація. Видалення магнію хлориду з препарату IgM здійснювалось гель-фільтрацією на колонці 1,5 × 20 см із сефадексом G-25. Препарат в об'ємі 3–4 мл наносився на гель, елюція проводилась фосфатним буфером із швидкістю 2 мл/хв. Вихід імуноглобуліну реєструвався при 280 нм.

Визначення концентрації IgM людини. Концентрація білка в препараті IgM людини визначалась спектрофотометричним методом при 280 нм (з огляду на те, що коефіцієнт екстинкції становив $E^{1\%} = 11,8$ [7]). Концентрація IgM людини в сироватці визначалась за допомогою набору реагентів для імуноферментного визначення концентрації загального імуноглобуліну класу М в сироватці крові "IgM общий – ИФА – БЕСТ" (Вектор-Бест, Росія).

Електрофорез. Електрофорез проводився у вертикальній камері в 12 %-ному поліакриламідному гелі (ПААГ) при наявності додецил-

сульфату натрію (ДСН) у редуруючих умовах. Як маркери молекулярної маси використовувався набір рекомбінантних білків. Білки в гелі фарбувались Coomassie Blue R-250 [8].

Результати і їх обговорення

Наші дослідження були спрямовані на відпрацювання методики імуноафінної хроматографії, що передбачало підбір моноклональних антитіл і оптимальних умов для синтезу імуноафінного носія, підвищення специфічності зв'язування IgM з імуноафінним сорбентом, підбір умов відмивання колонки і елюції IgM, а також контроль чистоти одержуваного препарату.

Для іммобілізації на сефарозі було використано отримані раніше моноклональні антитіла до IgM людини [9]. Підбір МКАТ проводився виходячи з результатів дослідження властивостей анти-IgM МКАТ у варіанті ТІФА IgM-"пастка". Для синтезу імуноафінного сорбенту було відібрано чотири клони (112C5.2, 111C2, 126G6, 125B5), які проявили високу активність у поєднанні з достатньою специфічністю при використанні їх у складі імуносорбенту в ТІФА для виявлення IgM-антитіл до вірусу простого герпесу та *Toxoplasma gondii* [9].

Встановлення оптимального часу іммобілізації МКАТ на сефарозі проводилось визначенням залишкової антитільної активності в реакційному буфері. Зниження титру антитіл 112C5.2 в імуноферментному аналізі вказувало на падіння концентрації МКАТ у розчині і їх зв'язок з носієм. Графік кінетики іммобілізації антитіл будовався на підставі результатів ТІФА, отриманих для проб з розведенням 1:400, при якому спостерігалось зниження оптичної густини від часу синтезу імуноафінного сорбенту. Графік залежності оптичної густини зразків у ТІФА від часу інкубації порівняно з контролем наведено на рис. 1. Аналіз кінетики іммобілізації моноклональних антитіл свідчить про можливість скорочення часу синтезу імуноафінного сорбенту до шести годин. Збільшення тривалості реакції більше шести годин не робить відчутним підвищення питомої концентрації зв'язаних із сефарозою МКАТ і призводить до часткової інактивації останніх.

Оптимізація методики очищення IgM людини почалась з порівняльної характеристики властивостей чотирьох імуноафінних сорбентів (з МКАТ 112C5.2, 111C2, 126G6, 125B5) і вибору умов елюції. Якість імуноафінних коло-

нок визначалась за такими властивостями: активністю зв'язування IgM сироватки та чистою елюйованого продукту. Дисоціація комплексу антиген–антитіло при імуноафінній хроматографії можлива завдяки підвищенню і зниженню рН, а також застосуванню хаотропних агентів [4]. Елюція IgM при високому значенні рН була неможлива через нестійкість імуносорбенту в лужному середовищі. Для елюції в кислих умовах найчастіше застосовуються 0,1 М HCl–гліциновий буфер, рН 2,5. Як хаотропний агент використовувався хлорид магнію, який ефективно руйнує комплекс антиген–антитіло і не має вираженого денатуруючого впливу.

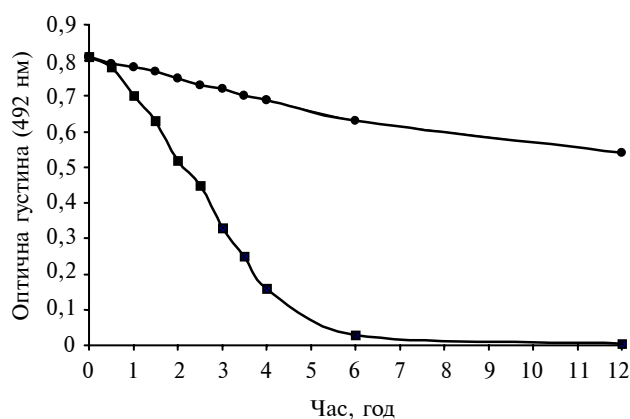


Рис. 1. Кінетика іммобілізації моноклональних антитіл на сефарозі 6-B: ■ — дослідні зразки; ● — контрольні зразки

Порівняння МКАТ проводилось за однією й тією ж схемою. Використовувались імуноафінні колонки однакового об'єму (2 мл), на кожну з яких наносилось по 1 мл сироватки з концентрацією IgM 1,21 мг/мл з швидкістю 0,2 мл/хв. Відмивання проводилось 0,05 М фосфатним буфером (рН становив 7,2–7,4), що містить 0,14 М NaCl з швидкістю 1 мл/хв. IgM елюювали двома способами: 3,5 М $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

і 0,1 М гліцин-HCl, рН 2,5. Концентрація IgM визначалась у сироватці, пропущеної через колонку, а також в елюйованій фракції.

Порівняльну характеристику варіантів імуноафінної хроматографії наведено в табл. 1. Аналіз результатів імуноафінної хроматографії дозволяє зробити висновок про ступінь придатності чотирьох МКАТ для синтезу сорбенту. За даними цієї таблиці антитіла 125B5 проявляли кращі характеристики порівняно з іншими МКАТ. Моноклональні антитіла 125B5 активніше зв'язували IgM сироватки, і, головне, чистота елюйованого імуноглобуліну була набагато вищою, ніж у випадку з іншими антитілами. Серед двох варіантів елюції, за допомогою $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ і гліцин-HCl, перший виявився кращим. При використанні розчину хлориду магнію IgM елюювався з колонки в більшій концентрації і елюція була повною. У той же час, гліциновий буфер дисоціював комплекс антиген–антитіло менш ефективно, що призводило до залишків IgM на колонці.

Після вибору виду агента для елюції бажано було знизити його концентрацію в розчині до мінімального значення, що ефективно дисоціює комплекс антиген–антитіло. Зниження молярності розчину хлориду магнію удвічі (до 1,75 М) не зменшувало його здатність елюювати імуноглобулін з колонки. Тому в наступних експериментах використовувалась саме ця концентрація.

Подальшим завданням з оптимізації процесу імуноафінної хроматографії стало підвищення чистоти одержуваного IgM. Для його реалізації можна використати два підходи: видалення баластових речовин сироватки, що зв'язалися з колонкою, підбором умов відмивання; попередження неспецифічного зв'язування компонентів сироватки з імуноафінним носієм. Реалізація першого з них зводилась до використання різних варіантів відмивання сорбенту з МКАТ 125B5 після нанесення сироват-

Таблиця 1. Порівняльна характеристика варіантів імуноафінної хроматографії

Характеристика	Варіанти елюції							
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$			Гліцин-HCl				
	112C5.2	111C2	125B5	126G6	112C5.2	111C2	125B5	126G6
Вихідна концентрація IgM, мг/мл	1,21	1,21	1,21	1,21	1,21	1,21	1,21	1,21
Концентрація IgM у фракції, що не зв'язалася, мг/мл	0,24	0,31	0,13	0,19	0,27	0,32	0,17	0,21
Кількість IgM в елюаті, мг	0,56	0,48	0,72	0,62	0,52	0,49	0,67	0,52

ки. Імуносорбент відмивався розчинами 0,5 М NaCl, 0,5 % тритоном і 0,05 % деоксихолатом натрію, а також фосфатним буфером, на якому були приготовлені всі згадані вище розчини. У всіх випадках елюція проводилась хлоридом магнію, а одержуваний продукт визначався із співвідношення IgM/загальний білок. Отримані результати вказували на незначне підвищення чистоти одержуваного IgM при використанні як відмиваючого розчину 0,5 М NaCl. Однак слід зазначити, що всі досліджувані варіанти відмивання показали дуже близькі результати, тому зміна їх умов практично не впливає на чистоту одержуваного імуноглобуліну.

Наступним кроком з оптимізації процесу імуноафінної хроматографії було нівелювання неспецифічного зв'язування компонентів сироватки із сорбентом. Одним із прийомів для підвищення ефективності імунохроматографічної очистки білків є використання передколонки з неспецифічними МКАТ [4, 7].

Імуноафінна очистка IgM проводилась у двох варіантах (з передколонкою і без неї), що дозволяло зробити висновок про ефективність використання передколонки. Проводилась також елюція імуноглобуліну і визначався його вміст. Результати порівняння даних варіантів імуноафінної хроматографії наведено в табл. 2. Отримані результати свідчать про значне підвищення ефективності процесу очищення IgM при використанні передколонки: концентрація одержуваного продукту виросла в 1,32 раза. Ефект передколонки пояснюється можливістю попереднього видалення компонентів сироватки, які взаємодіють з імуносорбентом і елюються разом із IgM, забруднюючи його препарат.

Таблиця 2. Порівняльна характеристика імуноафінної хроматографії з використанням передколонки

Характеристика	Варіант хроматографії	
	без передколонки	з передколонкою
Вихідна концентрація IgM, мг/мл	1,21	1,21
Концентрація IgM у фракції, що не зв'язалася, мг/мл	0,12	0,09
Сумарна кількість IgM в елюаті, мг	0,75	0,87
Вміст IgM в елюаті, %	74	98

Кінцева перевірка чистоти одержаного IgM проводилась за допомогою електрофорезу в ПААГ з ДСН. Для препарату імуноглобулінів було виявлено лише дві смуги, що відповідали важким і легким ланцюгам (рис. 2). Такі результати електрофорезу засвідчували високу чистоту одержаного препарату – вміст IgM наближався до 100 %.

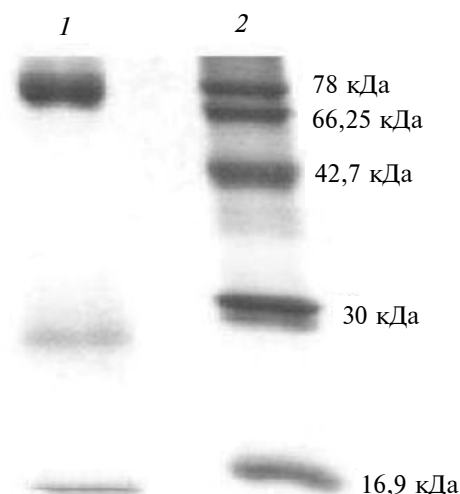


Рис. 2. Електрофореграма препарату IgM людини: 1 – маркери молекулярної маси; 2 – IgM людини

Висновки

Запропонована схема імуноафінного виділення і очищення IgM людини дає можливість одержувати добре відтворені результати при використанні різних сироваток. Оригінальна схема має відчутні переваги порівняно із схемами, заснованими на неспецифічних біохімічних та фізико-хімічних методах виділення даного імуноглобуліну. Вона не потребує значної кількості сироватки: втрати цільового продукту зводяться до мінімуму, і методика в цілому є більш простою. Ступінь чистоти одержуваного за розробленою схемою IgM не коливається від партії до партії і досягає майже 100 %, що дає можливість використовувати його для імунізації тварин та імуноаналізу.

З використанням запропонованої оригінальної методики можна отримати імуноафінні сорбенти для очистки імуноглобулінів інших класів.

О.Ю. Галкин

ПОЛУЧЕНИЕ ИММУНОАФФИННОГО СОРБЕНТА И РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ВЫДЕЛЕНИЯ IgM ЧЕЛОВЕКА

Разработана схема иммуноаффинного выделения и очистки IgM человека. Осуществлен подбор моноклональных антител и оптимизированы условия для синтеза иммуноаффинного носителя; повышена специфичность связывания IgM с сорбентом; подобраны условия отмывания колонки и элюции IgM. Степень чистоты получаемого по разработанной схеме IgM составляла приблизительно 100 %, что дает возможность его использования для иммунизации животных и применения в иммуноанализе.

O.Yu. Galkin

OBTAINING IMMUNOAFFINITY SORBENT AND DEVELOPING THE METHOD OF SPECIFIC PURIFICATION OF HUMAN IgM

We develop the scheme of immunoadfinity purification of human IgM. Through experiments performed, we select the monoclonal antibodies and optimize the conditions for synthesis of immunoadfinity matrix. Moreover, the specificity of IgM linking with a sorbent is increased and the conditions of washing the columns and elution of IgM are chosen. Since the developed scheme is highly effective in practice, the degree of purification of the obtained IgM has made up 100 %. It enables using this method for immunoassays and animals immunization.

1. *Антитела*. Методы: Кн. 1 / Пер. с англ.; Под ред. Д. Кэтти. — М.: Мир, 1991. — 288 с.
2. *Richman D.D., Cleveland P.H., Oxman M.N. et al.* The binding of staphylococcal protein A by the sera of different animal species // *J. Immunol.* — 1982. — **128**. — P. 2300–2305.
3. *Kronvall G.* A surface component in group A, C and G streptococci with non-immune reactivity for immunoglobulin G-binding properties // *Ibid.* — 1973. — **111**. — P. 1401–1406.
4. *Harlow E., Lane D.* Antibodies. A laboratory manual. — N.-Y.: Cold Spring Harbor, 1988. — 726 p.
5. *The human IgG subclasses*. Molecular analysis of structure, function and regulation / Ed. F. Shakib. — Oxford: IRL Press, 1990. — 280 p.
6. *Основи гібридомної технології: Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціаль-*

ності “Промислова біотехнологія” / Укладачі: О.Ю. Галкін, Л.М. Шинкаренко, І.В. Ніколаєнко, І.Р. Клечак. — К.: ІВЦ “Політехніка”, 2004. — 40 с.

7. *Goding J.* Monoclonal antibodies. Principles and practice. — San Diego: Academic press, 1996. — 492 p.
8. *Nikolayenko I.V., Galkin O.Yu., Grabchenko N.I. et al.* Preparation of highly purified human IgG, IgM and IgA for immunization and immunoanalysis // *Ukrainica Bioorganica Acta.* — 2005. — **2**, N 2. — P. 3–11.
9. *Галкін О.Ю., Ніколаєнко І.В., Дуган О.М.* Одержання та вивчення властивостей нових моноклональних антитіл до IgM людини // *Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики.* — 2009. — № 1.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ “КПІ”

Надійшла до редакції
11 березня 2009 року